

Système de test RELISA® anti-dsDNA

Pour diagnostique in vitro
Pour usage professionnel
No. de référence : 7096-17 (96 puits) et 7696-17 (576 puits)

USAGE PRÉCONISÉ : *Il s'agit d'un système de test par immunodosage enzymatique pour détecter des anticorps anti-dsDNA dans le sérum humain. Ce système de test sera utilisé pour faciliter le diagnostic du lupus érythémateux disséminé.*

Resume et description du test

Les patients à lupus érythémateux disséminé (LED) peuvent produire des anticorps dirigés contre une variété d'antigènes nucléaires, mais les anticorps dirigés contre Sm (antigène Smith) et l'ADN double brin (dsDNA) montrent la meilleure corrélation avec la maladie (1). Les anticorps anti-Sm démontrent un motif de coloration ANA tacheté alors que les anticorps anti-dsDNA démontrent généralement un motif de coloration ANA homogène. Bien que des niveaux faibles d'anticorps anti-dsDNA peuvent être présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de syndrome de Sjögren, de sclérodermie, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (2), des niveaux élevés d'anticorps anti-dsDNA sont retrouvés presque exclusivement dans le LED. Les anticorps anti-dsDNA seraient impliqués dans la pathogénie des variantes les plus graves du LED lorsque déposés sous forme de complexes immuns (3). Les anticorps anti-dsDNA ont un titre élevé, et, du fait qu'ils correspondent à l'activité de la maladie (4), leur détection est importante dans la prise en charge des patients à LED.

Plusieurs dosages sont disponibles pour la détection d'anticorps anti-dsDNA. Les méthodes les plus communément utilisées comprennent l'immunofluorescence indirect, le radioimmuno dosage, la contre-immuno-électrophorèse et l'immunodiffusion (5-8). Le système de test Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA est un dosage immunoenzymatique (EIA) qui détecte des anticorps anti-dsDNA dans le sérum.

Principe du test

Ce test est un EIA indirect. Les antigènes stabilisés du dsDNA ont été peints sur la surface de micropuits pour servir de substrat antigénique dans ce système. Des dilutions d'échantillons de patient sont placées dans les micropuits et mises à incuber, ce qui permet aux anticorps de l'échantillon de réagir avec l'antigène sur la phase solide. Après un lavage visant à éliminer les anticorps non liés et d'autres protéines sériques, les puits sont mis à incuber avec des anticorps antihumains de chèvre marqués à la peroxydase de raifort. La préparation d'anticorps conjugués à la peroxydase de raifort inclus dans le système de test est spécifique des chaines gamma d'IgG humaine.

Après incubation avec le conjugué à la peroxydase de raifort, si les résultats sont positifs, on observe la formation d'un complexe tripartite stable. Ce complexe se compose d'un anticorps antihumain conjugué à de la peroxydase de raifort liée à des anticorps anti-dsDNA humains, eux-mêmes liés à l'antigène stabilisé sur la surface en plastique.

Après un deuxième lavage, ce complexe est détecté par ajout d'une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) et de H_2O_2 servant de substrat chromogène. Le degré de développement de la couleur dans chaque puits est proportionnel à la concentration en anticorps anti-dsDNA dans chaque échantillon de sérum. Chaque micropuits est lu à 450 nm au moyen d'un spectrophotomètre.

Composition des systemes - materiels fournis

Conservation : Tous les composants doivent être conservés au réfrigérateur entre 2-10°C. Ne pas congeler.

Stabilité : Tous les composants sont stables pendant 12 mois à compter de la date de fabrication. Ne pas utiliser de composants au-delà de leur date de péremption.

RÉACTIFS

Barrettes de micropuits enduits de dsDNA PLATE: No. de référence 7008-17. Un cadre de micropuits qui contient douze barrettes de huit puits enduit de dsDNA. Si le test requiert moins de huit puits, ceux-ci peuvent être séparés par simple rupture. Remettre les barrettes non utilisées dans le sachet métallisé en présence du sachet absorbeur d'humidité, refermer hermétiquement, puis réfrigérer jusqu'à 45 jours maximum.

Diluant pour échantillon SOLN|DIL: No. de référence 7100 (100 ml). Diluant tamponné breveté, utilisé pour diluer les échantillons de patients.

Réactif immuno-enzymatique - Spécifique de l'IgG (chaine gamma) humaine CONJ|HRP: No. de référence 7009-17 (14 ml). IgG anti-humain (spécifique de la chaîne gamma) conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP). Le réactif est prêt à l'emploi.

Solution de substrat SOLN|SUB: No. de référence 7035 (14 ml). Solution de substrat enzymatique spécifique de la HRP, contenant de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) stabilisée et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le réactif est prêt à l'emploi.

Réactif d'arrêt SOLN|STOP: No. de référence 7033 (14 ml). Réactif d'arrêt breveté pour les systèmes de test IDE d'Immuno Concepts. Le réactif est prêt à l'emploi. **ATTENTION :** Corrosif. Ce réactif contient des acides chlorhydrique et sulfurique (moins de 3% chacun, par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

Contrôle positif anti-dsDNA CONTROL| +: No. de référence 7021-17 (2 ml). Sérum de contrôle positif humain qui contient des anticorps anti-dsDNA. Ce sérum est à dilution active et est prêt à l'emploi. Voir l'étiquette du tube pour plage attendue en Unités Internationales/ml (UI/ml).

Contrôle négatif CONTROL| -: No. de référence 7031 (2 ml). Sérum de contrôle négatif humain qui contient des anticorps anti-dsDNA. Ce sérum est à dilution active et est prêt à l'emploi.

Sérum étalon anti-dsDNA 1 à 4 CAL: Références catalogue 7261-17, 7262-17, 7263-17, 7264-17, (1,5 ml chacun). Sérum étalon humain qui contient des anticorps anti-dsDNA. Ces sérums étalons sont à dilution active et prêts à l'emploi. L'étalon 3 peut être utilisé comme étalon à point unique. Ces sérums calibrateurs ont été testés avec OMS de référence Wo80 préparation afin de déterminer la concentration en anticorps en unités internationales / ml (UI / ml). Voir les étiquettes des flacons pour les concentrations anticorps anti-ADN double brin en UI / ml.

COMPOSANTS NON RÉACTIFS
Portoir de micropuits

Solution tampon de lavage :
Tampon PBS PWDR|PBS: No. de référence 1011. Solution saline en poudre tamponnée au phosphate (0,01 M, pH 7,4 ± 0,2). Chaque sachet contient une quantité suffisante de poudre tampon pour préparer un litre de solution. (Chaque système complet contient deux sachets de poudre tampon pour chaque plateau de 96 micropuits).

Concentré tampon de lavage SOLN|WASH: No. de référence 1031 (10 ml). Solution de Tween 20 à 5% à utiliser dans le tampon de lavage. (Dans les kits complets il y a deux flacons de poudre tampon concentré pour chaque plateau de 96 micropuits).

> **Préparation:** Dissoudre une pochette de poudre tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter le contenu entier d'une bouteille de tampon de lavage concentré au PBS dissous. Bien mélanger et conserver au entre 2 et 25°C jusqu'à 4 semaines ou jusqu'à ce que des signes de contamination ou d'autres changements visibles se produisent. La solution tampon de lavage doit être à température ambiante (18-25°C) avant son emploi.

Utilisation: Tous les composants sont prêts à l'emploi sans nécessité de diviser en partie aliquote ou de reconstitution (sauf le tampon PBS qui doit être dissous dans de l'eau désionisée ou distillée avant utilisation).

Stabilité : Tous les composants sont stables pendant 12 mois à compter de la date de fabrication. Ne pas utiliser de composants au-delà de leur date de péremption.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE REQUIS MAIS NON FOURNI

Pipeteurs volumétriques de précision permettant de prélever des volumes de 25 à 1 000 µl
Pissette en plastique pour distribuer la solution tampon de lavage dans les micropuits ou système automatisé et semi automatisé de lavage des micropuits
Récipient d'un litre pour la solution PBS de tampon de lavage
Eau désionisée ou distillée
Spectrophotomètre lecteur de microplaques capable de lire la densité optique à 450 nm
Tubes à essai pour préparer les dilutions de sérum
Papier absorbant ou serviettes en papier
Pipeteur multicanaux capable de remplir 8 puits à la fois
Gants jetables
Minuterie de laboratoire

PRECAUTIONS

1. Tous les matériels d'origine humaine utilisés dans la composition de ce produit ont été testés au moyen de méthodes approuvées par la FDA américaine et se sont révélés négatifs (non-réactivité répétée) vis-à-vis des anticorps des virus de l'immunodéficience humaine 1 et 2 (VIH 1 et 2), des anticorps du virus de l'hépatite C (HCV) et de l'antigène de surface de l'hépatite B (HBSAg). Néanmoins, aucune méthode de test ne peut offrir la certitude de l'absence de VIH-1, VIH-2, HCV, HBV ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, tous les matériels du kit doivent être manipulés comme si potentiellement infectieux.
2. Tous les échantillons de patients doivent être manipulés conformément aux recommandations de niveau 2 de biosécurité, comme recommandé pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux dans le manuel du Centers for Disease Control/National Institutes of Health : *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 1999 Edition.*
3. La dilution des composants ou la substitution par des composants autres que ceux fournis avec ce système peut donner lieu à des résultats incohérents.
4. L'azide de sodium (0,09%) est utilisé comme agent de conservation. L'azide de sodium peut réagir au contact des canalisations en plomb ou en cuivre et former des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations à l'eau du robinet afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion.
5. Ce kit est destiné à une utilisation diagnostique *in vitro.*
6. Ne pas pipeter à la bouche et éviter tout contact de la peau et des muqueuses avec les réactifs et les échantillons. En cas de contact, laver abondamment avec un savon germicide et de l'eau.
7. Ne pas fumer, ni manger, ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
8. Éviter toute éclaboussure ou la production d'aérosols à tout moment.
9. Les durées et températures d'incubation autres que celles spécifiées peuvent donner lieu à des résultats erronés.
10. La contamination croisée de réactifs ou d'échantillons peut donner lieu à de faux résultats. Les échantillons doivent rester confinés aux micropuits pendant le test.
11. Avant réutilisation, la verrerie doit être lavée et rincée soigneusement afin d'éliminer tout détergent. Toute la verrerie doit être propre et sèche avant utilisation.
12. Porter les réactifs, micropuits et échantillons à température ambiante (18-25°C) avant utilisation
13. Mettre des gants jetables pour manipuler les échantillons et les réactifs, et se laver soigneusement les mains en fin de procédure.
14. La contamination microbienne des réactifs ou des échantillons peut donner lieu à de faux résultats.
15. Le réactif d'arrêt est corrosif et peut causer des brûlures. Ce réactif contient de l'acide chlorhydrique et sulfurique (moins de 3% chacun, par volume) et doit être manipulé avec précaution. Conserver hors de portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un médecin. Ne jamais ajouter d'eau à ce réactif.

PRELEVEMENT D'ECHANTILLONS

Prélèvement : Le sérum est l'échantillon préférentiel. Environ 5 ml de sang entier doivent être prélevés aseptiquement par ponction veineuse à l'aide d'un tube à prélèvement sous vide stérile ou tout autre système de prélèvement adéquat. Laisser le sang coaguler à température ambiante (18-25° C). Le sérum doit être séparé du caillot par centrifugation aussi rapidement que possible, de façon à limiter l'hémolyse.

Substances interférentes : Les sérums présentant un degré élevé d'hémolyse, d'ictère, de lipémie ou de prolifération microbienne doivent être écartés car ces anomalies peuvent donner lieu à de faux résultats. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant de procéder au test.

Conservation : Les sérums peuvent être conservés entre 2 et 10° C jusqu'à une semaine maximum. Si le test est reporté, ils seront congelés à –20° C minimum. Le sérum ne peut pas être conservé dans un réfrigérateur ou un congélateur à dégivrage automatique.

ATTENTION : Les congélations et décongélations successives d'échantillons de patient peuvent donner lieu à des résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

Remarques generales relatives a la procedure

1. Il est extrêmement important que tous les composants du kit et les échantillons de sérum soient à température ambiante (18-25°C) avant leur utilisation. Il faut plusieurs heures pour qu'un litre de tampon de lavage atteigne 20°C une fois sorti du réfrigérateur. Des températures d'incubation au-dessus ou en dessous de la plage indiquée peuvent donner lieu à des résultats inexacts. Remettre les échantillons et les réactifs non utilisés au réfrigérateur après utilisation.
2. Bien mélanger les réactifs en les retournant doucement. Ne pas passer les réactifs au vortex ni les secouer. Éviter de faire mousser.
3. Lors de la préparation des dilutions d'échantillon, essuyer les embouts des pipettes avant de distribuer le sérum dans le diluant pour échantillons. Si un excès d'échantillon adhère à l'embout de la pipette, les résultats s'en trouveront affectés.
4. L'utilisation d'un pipeteur multicanaux est recommandée car il permet d'uniformiser la distribution du réactif ainsi que les durées d'incubation et de réaction.
5. **Un lavage adéquat des puits est extrêmement important.** Des puits mal lavés afficheront des valeurs de bruit de fond élevées ainsi que des valeurs faussement positives. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits et ensuite les remplir de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage après aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les retournant, puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes de remplissage et vidange jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage. Pour un lavage homogène des puits, il est conseillé d'utiliser un système automatisé.
   REMARQUE : En raison des divers types de techniques de lavage et de systèmes automatisés, le nombre de lavages peut être adapté pour obtenir des résultats optimums. Chaque laboratoire doit déterminer le nombre de lavages le plus efficace pour son système de lavage.
6. Une élimination inadéquate de résidus du tampon de lavage peut conduire à un développement variable de la couleur. Éponger les barrettes de micropuits sur du papier ou des serviettes absorbants afin d'éliminer au maximum les résidus de tampon de lavage.
7. Le respect du minutage de toutes les étapes est essentiel. Tous les échantillons de sérum doivent être dilués avant le début de la procédure et déposés dans les micropuits aussi rapidement que possible (moins de cinq minutes). La taille des lots doit être définie de façon à ce que la manipulation des échantillons puisse être accomplie sans précipitation dans ce laps de temps. L'utilisation d'une pipette multicanaux facilite le maniement des échantillons et des réactifs, et est recommandée.
8. À l'exception de la dernière incubation (solution de substrat), chaque période d'incubation commence dès la fin de la distribution de l'échantillon ou du réactif. L'incubation de la solution de substrat doit durer exactement 30 minutes pour chaque puits. Tous les échantillons et réactifs doivent être distribués dans le même ordre et à un rythme constant.

Interpretation des resultats

CALCULS

1. Soustraire la valeur de densité optique du puits à blanc de celle obtenue dans les puits standards, de contrôle et d'échantillons de patient. Calculer les valeurs moyennes de densité optique des puits en double.
2. Porter les valeurs de densité optique moyennes de chaque sérum étalon 1 à 4 sur la feuille de travail de la courbe étalon RELISA® en utilisant l'O.D. blanc ajusté pour l'axe y et les valeurs marquées en UI/ml pour l'axe x. Tracer une droite de meilleur ajustement entre les points de l'étalon.
3. Obtenir la valeur en UI.ml de l'échantillon de chaque patient en interpolant à partir de la courbe étalon.
4. Si vous utilisez un logiciel, utilisez un ajustement à 4 paramètres à coordonnées log-lin pour densité optique et concentration, et une courbe de meilleur ajustement.

MÉTHODE D'ÉTALONNAGE À POINT UNIQUE FACULTATIF

1. Soustraire la valeur de densité optique des puits à blanc de celles obtenues dans les puits d'échantillonnage, de contrôle et d'échantillons du patient. Calculer les valeurs moyennes de densité optique des puits en double.
2. Diviser la concentration en anticorps spécifiques en UI/ml de l'étalon #3 (indiquée sur l'étiquette) par la valeur de densité optique moyenne des puits étalons pour obtenir le Facteur de conversion.
3. Multiplier les valeurs de densité optique de chacun des échantillons par le facteur de conversion afin d'obtenir la concentration en anticorps spécifiques en UI/ml.

4. La forme simplifiée de ces calculs peut être exprimée de la façon suivante :

   Valeur étalon #3 (UI/ml) x densité optique de l'échantillon* = UI/ml Valeur pour échantillon
   densité optique étalon #3

* Si les étalons et les échantillons sont exécutés en double, utiliser la moyenne des densités optiques des puits en double.

CONTRÔLE QUALITÉ

1. La valeur moyenne de densité optique de l'étalon #3 doit être d'au moins 0,400. Les valeurs de densité optique inférieures à 0,400 indiquent un développement de couleur inadéquat et une exécution invalide. Le développement de couleur inadéquate est habituellement dû à l'utilisation de réactifs froids ou à une durée inexacte pour une ou plusieurs étapes du dosage. Laisser les réactifs de se réchauffer à température ambiante (18-25°C), et répéter l'exécution en faisant particulièrement attention au temps de chaque étape.
2. Le puits de contrôle à blanc doit avoir une valeur de densité optique inférieure à 0,150. Les valeurs de densité optique à blanc supérieures à 0,150 indiquent un lavage inadéquat ou une contamination des réactifs et une exécution invalide.
3. Les valeurs d'anticorps anti-dsDNA obtenues pour les sérums de contrôle positifs et négatifs doivent être comprises dans la plage indiquée sur l'étiquette. Cette plage a été établie pour englober 95% des valeurs attendues suite à une variation statistiquement normale. De faibles écarts peuvent occasionnellement être observés hors de ces plages. Chaque laboratoire doit établir ses propres critères d'acceptation/de rejet en se fondant sur sa propre expérience avec ce dosage.
4. Les échantillons dont les valeurs d'anticorps spécifiques sont plus élevées que la limite supérieure de l'étalon #3 devraient être rapportés comme plus élevés que la valeur de l'unité de l'étalon #3.
5. La courbe étalon doit être tracée pour chaque exécution (ou alors un Facteur de conversion doit être calculé si vous utilisez l'étalonnage facultatif à point unique). L'utilisation d'une courbe étalon d'une autre analyse invalidera les résultats.
6. Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage de référence (normale), en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.
7. Le contrôle positif est un sérum humain qui contient des anticorps anti-dsDNA. Il s'agit d'un contrôle qualitatif qui devrait donner une valeur plus élevée que 35 UI/ml.
8. Le contrôle négatif est un pool de sérum humain qui ne contient pas d'anticorps anti-dsDNA. Ce contrôle devrait donner des valeurs inférieures à 35 UI/ml.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE PATIENTS

Les niveaux d'anticorps anti-dsDNA ont montré des augmentations et des chutes au cours de la maladie, mais la signification clinique d'un seul niveau d'anticorps est encore à l'étude (13). Les valeurs d'unité obtenues dans ce dosage ont été conçues simplement pour séparer les patients dans les groupes généraux suivants. Les puits d'échantillons de patients qui ont des valeurs calculées plus élevées ou égale à 35 UI/ml sont considérés comme positifs. Les puits d'échantillons de patients qui ont des valeurs calculées inférieures à 35 UI/ml sont considérés comme négatifs. Chaque laboratoire doit établir ses propre plage de référence et valeurs seuils sur base de la population de patients qui sont testés. Les valeurs d'unité sont affectées par des facteurs de patient, des considérations mécaniques (telles que précision et exactitude du pipetage), et des conditions de dosage (telles que température et durée des étapes.) Des déterminations en série de niveaux d'anticorps sur un patient peuvent indiquer la montée ou la chute de niveaux d'anticorps.

RAPPORT DES RÉSULTATS

Les résultats devraient être rapportés comme positifs ou négatifs pour les anticorps anti-dsDNA, au moyen de la valeur UI/ml. Les niveaux d'anticorps trouvés dans un échantillon unique ont une signification clinique limitée. Des déterminations en série de niveaux d'anticorps sur un patient peuvent indiquer la montée ou la chute des niveaux d'anticorps (13).

Limites de la procedure

1. Le diagnostic ne peut être fait à partir de la seule détection d'anticorps anti-dsDNA. Le médecin doit interpréter ces résultats conjointement avec le dossier et les symptômes du patient, les conclusions physiques et d'autres procédures diagnostiques.
2. Le traitement ne peut pas commencer basé sur le seule test positif pour les anticorps anti-dsDNA. Les indications cliniques, d'autres résultats de laboratoire et l'impression clinique du médecin doivent être pris en considération avant de commencer tout traitement.
3. Certains médicaments, y compris la procainamide et l'hydralazine, peuvent induire une maladie semblable au lupus érythémateux. Les patients souffrant de LE induit par un médicament peuvent montrer des ANA positifs dirigés communément contre des histones nucléaires, bien que les anticorps anti-dsDNA aient aussi été rapportés (9-10, 14).

4. Bien qu'un haut niveau d'anti-dsDNA puisse fortement suggérer un LED, il ne peut pas être considéré comme diagnostique mais doit plutôt être interprété comme faisant partie de l'historique clinique général d'un patient. De faibles niveaux d'anticorps anti-dsDNA sont souvent présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de syndrome de Sjögren, de sclérose systémique progressive, de dermatomyosite, de lupus érythémateux discoïde et de connectivité mixte (2).
5. Les patients sous thérapie aux stéroïdes peuvent avoir des résultats négatifs pour les anticorps anti-dsDNA (11).
6. Les résultats de ce test doivent être utilisés conjointement aux renseignements disponibles venant de l'évaluation clinique et d'autres procédures diagnostiques pour permettre de déterminer l'état clinique d'un patient.

Valeurs attendues

La valeur attendue dans la population normale est négative (moins que 35 UI/ml). Jusqu'à 70% des patients atteints de lupus disséminé peuvent présenter des anticorps anti-dsDNA (15). Certains médicaments peuvent induire la production d'anticorps anti-dsDNA (14).

Caracteristiques de performance

Le système de test Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA-ES a été comparé à un autre système de test EIA d'IgG anti-dsDNA à spécificité rehaussé et distribué dans le commerce. La population étudiée comprenait 108 échantillons positifs pour ADN double brin et 100 échantillons normaux des donneurs de sang qui ont été testés en parallèle sur le dispositif de prédicat et le dispositif étudié. Sur la base de cette comparaison, les données suivantes ont été obtenues en utilisant le point-étalonnage de la méthode multi:

		Prédicat Test IgG anti-dsDNA	
		Positifs	Négatifs
Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA	Positifs	105	6
	Négatifs	3	94

Ces données donnent les statistiques suivantes : accord positif, 97,2%; accord négatif, 94,0%, et un accord global, 95,7%.

Sur base de cette comparaison, les données suivantes ont été obtenues au moyen de la méthode facultative à point unique :

		Prédicat Test IgG anti-dsDNA	
		Positifs	Négatifs
Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA	Positifs	103	5
	Négatifs	5	95

Ces données donnent les statistiques suivantes : accord positif, 95,4%; accord négatif, 95,0%, et un accord global, 95,2%.

Normal Gamme: Les limites de la normale pour ce dosage a été déterminée en testant des échantillons de sérum de 261 donneurs de sang sains. Seuls deux de ces échantillons avaient des valeurs supérieures à 35 UI / ml anticorps anti-ADN double brin

SPÉCIFICITÉ CLINIQUE
Le système de test Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA a été utilisé pour tester des échantillons de sérum de 117 patients qui ont été vus en consultation de rhumatologie. Cette population de patients a été sélectionnée à cause de maladies rhumatismales cliniques, mais pas pour un état de maladie spécifique quelconque. Parmi cette population, quatre échantillons (3,4%) se sont montrés positifs pour anticorps anti-dsDNA.

SENSIBILITÉ CLINIQUE
Des échantillons de sérum de 39 patients atteints de LED ont été testés par le système de test Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA. Huit (20,5%) de ces échantillons étaient positifs pour les anticorps anti-dsDNA.

REPRODUCTIBILITÉ
La précision du dosage a été mesurée par trois échantillons qui avaient des valeurs anti-dsDNA dans la portion linéaire de la courbe d'étalonnage. Ces échantillons ont été exécutés 20 fois sur trois numéros de lot différents de barrettes de micropuits enduits d'antigène en un seul événement d'analyse et par un technicien. La précision intra-dosage et inter-dosage est montrée dans les Tables suivantes:

PRÉCISION INTRA-DOSAGE

n=20	Moyenne (UI/ml)	E.T.	% C.V.
Spécimen 1	610	14	2
Spécimen 2	315	14	5
Spécimen 3	114	10	9

PRÉCISION INTER-DOSAGE

n=60	Moyenne (UI/ml)	E.T.	% C.V.
Spécimen 1	601	24	4
Spécimen 2	329	16	5
Spécimen 3	122	11	9

VALIDATION DE L'ÉTALONNAGE À POINT UNIQUE

L'utilisation d'un étalon à point unique a été validée au moyen du même panneau de 108 sérums qui ont été utilisés pour comparaison à l'appareil à prédicats. L'analyse de régression de cette comparaison a montré un coefficient de régression (r^2) de 97,95%. D'un point de vue pratique, nous n'avons vu que trois échantillons dans cette comparaison (2,7%) qui ont montré des contradictions diagnostiques entre le système d'étalonnage à quatre points et le système d'étalonnage facultatif à point unique. Tous ces échantillons avaient des valeurs anti-dsDNA UI/ml près du seuil de 35 UI/ml, entre 33 et 40 UI/ml. Ce type d'échantillon est un problème diagnostique dans tout système de dosage, et doit être considéré avec soin par les professionnels de laboratoire qui analysent les échantillons et interprètent les résultats.

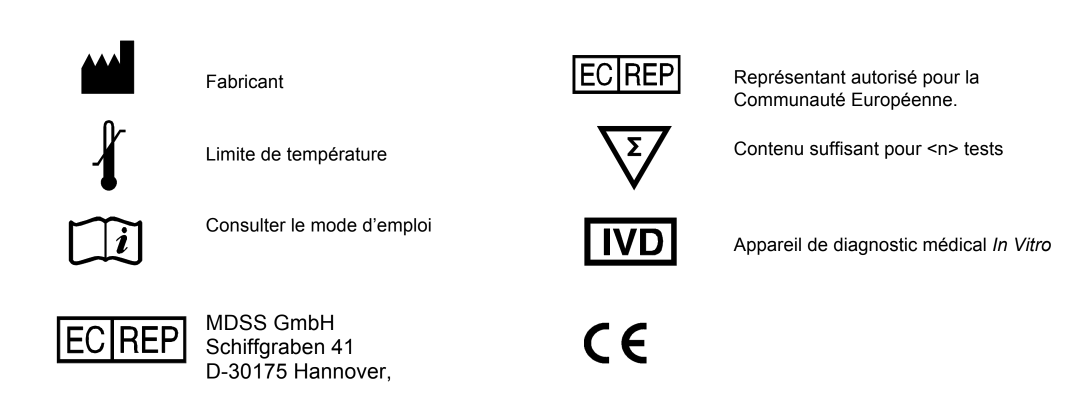
ÉTUDES DE RÉACTIVITÉ CROISÉE

Onze sérums qui contenaient des autoanticorps y compris Sm, RNP, SSA, SSB, Scl-70 et Jo-1 ont été testés au moyen du système de test Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA. Aucun de ces échantillons n'a produit de résultat positif dans le système de test Immuno Concepts RELISA® anti-dsDNA.

BIBLIOGRAPHIE

1. Nakamura, R. M., Greenwald, C. A., Peebles, C. L., et al. Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA): Immunochemical Specificities and Significance in Systemic Rheumatic Disease. Chicago, American Society of Clinical Pathologists, 1978.
2. Notman, D.D., Kurata, N., Tan, E.M. Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases. Ann. Int. Med. 83:464-469, 1975.
3. Stingl, G., Meingassner, J. G., Swelty, P., et al. An Immunofluorescence Procedure for the Demonstration of Antibodies to Native, Double-Stranded DNA and of Circulating DNA-Anti-DNA Complexes. Clin. Immunol. Immunopathol. 6:131-140, 1976.
4. Edmonds, J. P., Johnson, G. D., Ansell, B.M., et al. The Value of Tests for Antibodies to DNA in Monitoring the Clinical Course of Systemic Lupus Erythematosus. A Long Term Study Using the Farr Test and the DNA Counterimmunoelectrophoretic Method. Clin. Exp. Immunol. 22:9-15, 1975.
5. Wold, R. T., Young, F. E., Tan, E. M., et al. Deoxyribonucleic Acid Antibody: A Method to Detect its Primary Interaction With Deoxyribonucleic Acid. Science 161:806-807, 1968.
6. Ginsberg, B., Keiser, H. A Millipore Filter Assay for Antibodies to Native DNA in Sera of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. 16:199-207, 1973.
7. Schur, P. H., DeAngelis, D., Jackson, J. M. Immunological Detection of Nucleic Acids and Antibodies to Nucleic Acids and Nuclear Antigens by Counterimmunoelectrophoresis. Clin. Exp. Immunol. 17:209-218, 1974.
8. Crowe, W., Kushner, I. An Immunofluorescent Method using *Crithidia luciliae* to Detect Antibodies to Double Stranded DNA. Arth. Rheum. 20:811-814, 1977.
9. Epstein, W. V. Specificity of SLE Serum Antibody for Single-Stranded and Double-Stranded DNA Configuration. J. Rheum. 2:215-220, 1975.
10. Alarcon-Segovia, D., Fishbein, E. Patterns of Antinuclear Antibodies and Lupus-Activating Drugs. J. Rheum. 2:167-171, 1975.
11. Ballou, S.P., Kushner, I. Anti-Native DNA Detection by the *Crithidia luciliae* Method. Arthritis Rheum. 22:321-328, 1979.
12. Data on file, Immuno Concepts, N.A., Ltd.
13. Kavanaugh, A.F., Solomon, D.H., et al. Guidelines for Immunologic Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: Anti-DNA Antibody Tests. Arthritis Care Res. 47:546-555,, 2002.
14. Vedove, C.D., Giglio, M.D., Schena, D., et al. Drug-induced Lupus Erythematosus. Arch. Dermatol. Res. 301:99-105, 2009.
15. Egner, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. J. Clin. Pathol. 53:424-432, 2000.

Au cas où l'emballage protecteur est abimé, veuillez contacter Immuno Concepts avant utilisation.



Immuno Concepts, N.A. Ltd. 9825 Goethe Road, Suite 350 Sacramento, CA. 95827
Assistance technique Aux É-U : 1.800.251.5115 Hors des É-U : 1.916.363.2649
Courriel : technicalsupport@immunoconcepts.com

Procédure de test RELISA® anti-dsDNA

Tous échantillons, réactifs (y compris solution tampon de lavage), et les micropuits doivent être à température ambiante avant leur emploi.

1. **PREPARER LA FEUILLE DE TRAVAIL**
Étiqueter la feuille de travail qui est jointe dans le kit pour indiquer la position des échantillons dans les micropuits. Doser les étalons en double. Pour utiliser la courbe multi-points, les quatre sérums étalons doivent être exécutés. Pour la méthode d'étalonnage facultative à point unique, n'exécuter que le sérum Étalon #3 en double. Un puits est utilisé pour un réactif à blanc. Nous recommandons que chaque contrôle et échantillon de patient soit dosé en double jusqu'à ce qu'une précision acceptable pour le dosage soit établie dans votre laboratoire.

2. **PRÉPARER LA SOLUTION TAMPON DE LAVAGE** (PBS-Tween)
Dissoudre le contenu d'une pochette de poudre tampon dans un litre d'eau désionisée ou distillée. Ajouter le contenu entier d'une bouteille de concentré de tampon de lavage au contenant de 1L de PBS dissous. Bien mélanger. La solution tampon de lavage peut être couverte et stockée à 2-25°C jusqu'à quatre semaines.

3. **DILUER LES ECHANTILLONS DE PATIENTS**
Diluer les échantillons de patient à 1:40 en ajoutant 25 µl de sérum à 975 µl de diluant d'échantillons. Bien mélanger. Les étalons, contrôles positifs et négatifs sont fournis à la dilution active et ne demandent pas de dilution supplémentaire.

4. **PREPARER LES MICROPUITS**
Retirer le nombre requis de barrettes de micropuits de la pochette et les placer dans le portoir. Les micropuits doivent être positionnés fermement dans le portoir. Appuyer fermement vers le bas aux deux extrémités des barrettes afin qu'elles se logent fermement dans le portoir. Si on utilise des puits individuels ou moins qu'une pleine barrette de puits, il faut veiller à ce que chaque puits soit fermement logé. Les puits qui sont logés correctement dans le portoir ne tomberont pas lorsque le portoir est retourné. Si le test requiert moins de huit puits, ceux-ci peuvent être séparés par simple rupture. Remettre les barrettes non utilisées dans la pochette métallisée, refermer hermétiquement, puis réfrigérer jusqu'à 45 jours maximum.

5. **DISTRIBUER LES DILUTIONS DE SERUM**
Distribuer 100 µl d'étalons, de contrôles et d'échantillons dilués de patients dans les puits appropriés comme décrit sur la feuille de travail. Distribuer 100 µl de diluant d'échantillon dans le puits du réactif à blanc.

6. **INCUBER LES BARRETTES** (30 minutes à température ambiante, c.-à-d. 18-25 °C)
Mettre à incuber 30 minutes à température ambiante. Les barrettes devraient être abritées des courants d'air ou des changements de température pendant l'incubation. Les barrettes peuvent être éventuellement recouvertes d'une bande transparente ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.

7. **LAVAGE DES BARRETTES** (consulter les notes 5 et 6 de la procédure générale)
Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage au PBS-Tween. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis les remplir de solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage après aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les retournant, puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes de remplissage et vidange jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.

8. **DISTRIBUER LE REACTIF ANTICORPS ENZYME**
Distribuer 100 µl de réactif Anticorps Enzyme dans chacun des puits.

9. **INCUBER LES BARRETTES** (30 minutes à température ambiante, c.-à-d. 18-25 °C)
Mettre à incuber 30 minutes à température ambiante. Les barrettes devraient être abritées des courants d'air ou des changements de température pendant l'incubation. Les barrettes peuvent être éventuellement recouvertes d'une bande transparente ou d'une serviette en papier pour les protéger de la poussière ou d'autres corps étrangers.

10. **LAVER LES BARRETTES**
Laver les puits 3 à 5 fois avec la solution tampon de lavage au PBS-Tween. Pour le lavage manuel, aspirer le contenu des puits puis les remplir solution tampon de lavage. Éviter la contamination croisée des puits, en particulier lors du premier lavage après aspiration. Vider toute la solution tampon de lavage des puits en les retournant, puis en les secouant d'un geste sec du poignet afin d'éliminer tout résidu. Répéter ces étapes de remplissage et vidange jusqu'à effectuer 3 à 5 lavages au total. Frapper ensuite vigoureusement les puits sur une serviette en papier ou une autre matière absorbante pour éliminer toute trace résiduelle de tampon de lavage.

11. **DISTRIBUER LA SOLUTION DE SUBSTRAT**
Avec une minuterie pour assurer des intervalles réguliers, distribuer 100 µl de solution de substrat dans chacun des puits. La solution de substrat doit être ajoutée aux puits à un rythme stable afin que chaque puits soit incubé pendant exactement la même durée (30 minutes). La solution de substrat dans les puits incubés avec les échantillons positifs tournera au bleu, et la solution dans les puits incubés avec des échantillons négatifs sera incolore ou bleue très pâle.

12. **INCUBER LES BARRETTES** (Exactement 30 minutes à température ambiante, c.-à-d. 18-25 °C)
Mettre à incuber 30 minutes exactement à température ambiante. Les barrettes devraient être abritées des courants d'air ou des changements de température pendant l'incubation.

13. **DISTRIBUER LE REACTIF D'ARRET**
Après que le premier puits a incubé pendant exactement 30 minutes, ajouter 100 µl de réactif d'arrêt à chacun des puits, dans le même ordre et au même rythme que pour la solution de substrat. Au moment de l'addition du réactif d'arrêt, la solution bleue de substrat virera au jaune et la solution incolore restera incolore.

14. **LIRE LES DENSITES OPTIQUES DES PUITS**
Dans les 30 minutes qui suivent l'addition du réactif d'arrêt, les puits doivent être lus dans un spectrophotomètre de lecture de plaque. Les puits sont lus à 450 nm contre le contrôle vierge. Si un spectrophotomètre de longueur d'onde double est disponible, la longueur d'onde pour le filtre de la référence doit être mise sur 600-650 nm. La lecture des micropuits à 450 nm sans filtre de référence résultera en des valeurs de densité optique plus élevées.

POUR L'ASSISTANCE TECHNIQUE: +1-916-363-2649
ou messagerie électronique :
technicalsupport@immunoconcepts.com

